

Modified MRS 배지용 탄소원 조제 및 *L. plantarum* 유래의 Bacteriocin의 항균 활성

유다정 · 박귀근*

가천대학교 바이오나노대학 식품생물공학과

Preparation of Carbon Source for Modified MRS Medium and Antibacterial Activity of Bacteriocin from *L. plantarum*

DaJung Yu and GwiGun Park*

Department of Food and Bioengineering, Ga Chon University

Abstract

β -mannanase from *Trichoderma reesei* was purified by DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-100 gel chromatography. The molecular weight was determined to be 54 kDa by tricine SDS-PAGE. *Trigonella foenum-graecum* galactomannan was hydrolyzed by the purified β -mannanase, and then the hydrolysates were separated by Bio-Gel P2 chromatography. The main hydrolysates were composed of D.P. (degree of polymerization) 2, 3, and 4, 6 galactomanno-oligosaccharides. To investigate the effects of *Trigonella foenum-graecum* galactomanno-oligosaccharides on in vitro growth of *L. plantarum*, were cultivated individually on a modified-MRS medium containing carbon sources such as low- and high-molecular-weight galactomanno-oligosaccharide. *Lactobacillus plantarum* grew 1.8-fold after treatment with high- and low-molecular-weight galactomanno-oligosaccharides, compared to 1.3-fold for those with standard MRS medium. Bacteriocin was purified by Sephadex G-100 gel chromatography and determined to be 122 kDa by tricine SDS-PAGE. The bacteriocin activated doubly more effectively after treatment with galactomanno-oligosaccharides compared to those with standard MRS medium. Bacteriocin showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The inhibitory compound lost activity when heated to temperatures greater than 30°C and when inhibited to pH changes that lowered the pH below 4 or raised it above 5. Furthermore, its effects were inhibited by treatment with proteolytic enzymes.

Key words: galactomannan, *Trichoderma reesei*, *Lactobacillus plantarum*, intestinal bacteria, bacteriocin

서 론

비피도박테리아는 장내 혹독한 환경에서 살아남을 수 있는 힘을 길러왔으며 핵심 효소인 fructose-6-phosphoketolase (EC)를 중심으로 하는 “bifid shunt”라는 대사 경로를 통해 hexose sugar를 대사한다(Sela et al., 2008; Pokusaeva et al., 2011). 대장 안에 주로 서식하는 장내세균은 자칫 영양이 결핍될 수 있으므로 인간을 포함한 숙주가 소화시키지 못해 결과적으로 대장까지 온 탄수화물을 분해시킬 수 있는 유전자를 만든다. 펙틴이나 헤미셀룰로오스, 자일란과 같은 식물에서 유래하는 복합 탄수화물은 비피도박테리아의 먹이인 prebiotics가 된다(O'Callaghan & van Sinderen,

2016). *Bifidobacterium* 속, *Lactobacillus* 속과 같은 프로바이오틱 균주는 비소화성 영양성분인 prebiotics가 생육활성 증식 뿐만 아니라 bacteriocin 생합성을 촉진한다(Audisio et al., 2001). 유산균의 bacteriocin 생산량과 생산 균주의 성장 속도는 비례 관계이며, 배양 시간이 경과할수록 활성이 증가하고 주로 대수 증식기 후반에 최대 활성에 이른다 알려져 있다. 최대의 bacteriocin 생산은 균종마다 차이가 있으며 생산균의 성장 단계에 따라 상이하다(Al-Jumaily et al., 2014). Bacteriocin은 단백질성 물질이므로 체내 단백질 가수분해 효소에 의해 쉽게 분해되므로 인체 무독성이고 잔류성이 없으며, 다양한 식중독 균에 대한 증식 억제 및 사멸 효과로 인해 생물학적 보존제나 생물 제어제로서의 적용이 가능하다(Deegan et al., 2006; Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010). *Staphylococcus aureus*는 즉석 조리 식품에서 가장 중요한 식중독균(Genigeorgis, 1989; Wieneke et al., 1993)으로 이 균의 단백질 독소인 장관독소(enterotoxin)는 열에 강하여 100°C에서 30분 정도 가열처리로는

*Corresponding author: Gwigun Park, Department of Food Science & Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
Tel: +82-31-750-5383; Fax: +82-31-750-5383
E-mail: ggpark@gachon.ac.kr

Received April 17, 2018; revised December 30, 2018; accepted February 8, 2019

거의 무독화 되지 않고 섭취한 사람에게 급성위장장애를 일으킨다(Jang et al., 2005). 따라서 *Lactobacillus plantarum*에 대한 항균활성효과로 인해 병원미생물 제어 항균제로서의 효용 가치도 기대되고 있다(Ogunbanwo et al., 2003). 하지만 장내미생물 유래의 항균물질은 정제 전에는 유색, 유취라는 문제점이 있어 산업적으로 이용하는데 한계가 있어 정제단계를 거쳐야 한다(Mahrous et al., 2013). Chromatography로 항균물질을 정제할 경우 생산 단가가 올라가고 처리 과정 중 일부 활성이 소실될 수도 있다. 따라서 prebiotics를 이용하여 bacteriocin의 생합성을 촉진하여 bacteriocin의 생산량을 높여 산업적으로 이용하게 될 때 생산 비용을 절감시키고 항생제를 대체시킬 수 있는 안전한 항균물질로서 병원성 미생물을 제어하는데 효과적일 것이다(Jozala et al., 2007). Mannan 계열의 갈락토만난(galactomannan) 성분을 풍부히 함유하고 있는 콩과 식물 *Trigonella foenum-graecum*는 D-galactose 단위에 대한 D-mannose의 평균비율은 대략 1:1.2로 구성되어 있다(Jiang et al., 2007; Bera et al., 2018). 본 연구실에서는 bifidobacterium의 생육활성에 효과를 보이는 gum 유래 galactosyl manno oligosaccharide와 konjac 유래 glucosyl manno oligosaccharide의 장내세균의 우수한 생육활성을 보고한 바 있다(Lee & Park, 2008). 결론적으로 본 연구에서는 *Trichoderma reesei* 유래 정제된 β -mannanase를 활용하여 *Trigonella foenum-graecum* galactomannan으로부터 galactomannan-oligosaccharides를 생산 및 정제하여 고중합도와 저중합도별 *Lactobacillus plantarum*의 생육활성 증진을 확인하며 이에 따른 *L. plantarum*의 bacteriocin 생산 및 정제를 통해 항균제 감수성 실험을 진행하여 병원성 미생물의 제어 효과를 입증하였다.

재료 및 방법

기질 조제법

*Trigonella foenum-graecum*으로부터 Galactomannan 조제를 위해 DattaRimi의 방법에 따라 수행하였다(Datta & Bandyopadhyay, 2005).

Trichoderma reesei 유래 β -mannanase 생산

본 실험에 사용된 *Trichoderma reesei* KCCM35503는 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)로부터 분양받았으며 효소생산 액체배지 100 mL에 접종하여 30°C, 150 rpm, 72시간 배양하였다(Zurbriggen et al., 1990). 배양액은 4°C 9,000×g, 10분간 원심분리(JXN-30, Beckman, Indianapolis, IN, USA)하여 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

β -Mannanase의 활성 측정

효소 활성 측정은 Dinitrosalicylic acid (Sigma Chemical

Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 β -mannanase의 생산량은 DNS환원당 정량법(Miller, 1959)에 의하여 수행하였으며 최근 보고된 방법(Park et al., 2013)으로 측정하였다.

환원당의 정량

DNS 환원당 정량법(Miller, 1959)에 의하여 수행하였다. 즉 mannose를 함유한 가수분해물 0.1 mL와 DNS 시약 1.0 mL를 혼합하여 10분간 물증탕을 하여 냉각시킨 후 희석하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-mannose를 0.1-1.0 mg/mL를 사용하였다.

효소정제

DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)는 column (2.5 cm × 30 cm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 충전시켜 50 mM Citrate buffer (pH 5.0)로 평형화 하였다. 이후 투석한 조효소액(47.4 unit/10 mL)를 column에 loading하였으며 0-0.5 M NaCl로 gradient 농도 구배하여 용출하였다. 이때 용출속도는 40 mL/h로 하였고, 용출액은 5 mL씩 분획수집기(pH 18-1003-64, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 받았다. 활성 분획을 회수하여 ultrafiltration (AMICON Cell 8010, Millipore Co., Bedford, MA, USA)을 이용하여 농축시킨 후, Sephadex G-100 (Pharmacia Biotech, Sweden)는 column (1.5 cm × 50 cm, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 충전시켜서 50 mM Citrate buffer (pH 5.0)으로 평형을 유지 시킨 후, 농축된 활성 분획을 용출시켰다. 이때 용출속도는 30 mL/h로 하였고, 용출액은 5 mL씩 fraction collector에 모았고, SDS-PAGE를 통해 순도 확인 후 정제 효소액으로 사용하였다. Tricine SDS-PAGE 상에서 나타난 band와 protein size marker의 relative mobility를 계산하고 작성한 그래프를 이용하여 분자량을 확인하였다(Laemmli, 1970).

Galactomannan 가수분해물의 분리 및 thin layer chromatography (TLC)

정제 β -mannanase (511.92 unit/10 mL)에 galactomannan 0.5%를 50°C 3시간 가수분해 한 뒤 Bio-Gel P-2 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)는 증류수에서 25°C 4시간 활성화한 후 탈기하여 column (3 cm × 120 cm)에 충전하였다. 24시간 동안 증류수를 이용하여 평형화 후 가수분해 용액을 주입하고, 60 mL/hr 유속으로 시험관 당 10 mL씩 용출하여 galactomannan-oligosaccharides를 분리한 뒤 McCleary BV의 방법으로 TLC를 수행하였다(McCleary, 1982).

Timell 방법에 따른 중합도 결정

Total reducing sugar (TRS)을 direct reducing sugar (DRS)으로 나눈 값을 가수분해된 galactomannan-oligosaccharides의

중합도로 결정하였으며(Timell et al., 1956), 최근에 보고된 방법(Park et al., 2013)과 동일하게 수행하였다.

가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.에 대한 생육활성

L. plantarum ATCC8014는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받았으며 혐기적 조건하에서 37°C 48시간 동안 배양 하였다. *L. plantarum* ATCC8014 대한 생육촉진 활성을 측정하기 위해 MRS배지에서 탄소원을 포도당 대신에 분리 조제된 중합도별 galactomanno-oligosaccharides를 회수하고 이를 LMOS (Low-molecular weight galactomanno-oligosaccharides, DP2+3)와 HMOS(High-molecular weight galactomanno-oligosaccharides, DP4+6)인 두 그룹으로 나누어 연구를 진행 하였다. 진공 농축시킨 후 DNS법을 이용하여 dextrose와 동일한 환원당량으로 조절한 후 121°C 15분간 멸균한 modified MRS 배지를 조제하여, 초기균수 10⁴ CFU/mL로 각각 접종하여 혐기적 조건하에서 37°C 48시간 평판배양한 후 colony수를 MRS 배지와 비교하고(Deya et al., 1982), 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총 균수를 MRS 배지와 비교하였다(Toba, 1985).

L. plantarum ATCC8014 유래의 bacteriocin에 대한 항균활성

Bacteriocin의 항균 활성은 *S. aureus* KCCM11335를 대상으로 Paper disk method으로 측정 하였다. *S. aureus* KCCM11335는 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)로부터 분양받았으며 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. *S. aureus* KCCM11335의 생균수를 McFarland 0.5판(1.5 × 10⁸ CFU/mL)으로 조정하였고, Tryptic Soy Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 접종 한 뒤 평판배지 위에 항균물질을 가한 paper disc(8 mm, Advantec., Toyo Co., Tokyo, Japan)를 놓고 배양하였다.

Crude bacteriocin 용액 제조 및 정제

L. plantarum ATCC8014은 100 mL modified MRS에서 초기균수 10⁴ CFU/mL로 각각 접종하여 혐기적 조건에서 37°C 16시간 정치배양을 하였다. 배양액은 4°C 8,000×g, 6분간 원심분리하여 얻은 상층액을 취하였으며 0.45 µm filter (Milipore, Schwalbach, Germany)로 여과하여 culture supernatants로 사용하였다. Culture supernatants는 90% (NH₄)₂SO₄를 처리하여 4°C 12시간 반응하였으며 4°C 8,000×g, 10분간 원심분리 후 상층액과 침전물로 분리 하였다. 침전물은 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)에 현탁한 후 투석막(16 mm × 30 cm, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용해 4°C 24시간 투석하였고 이를 crude bacteriocin 용액으로 사용하였다. Sephadex G-100을 column (2.5 cm × 30 cm, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 충

진시키고 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액으로 평형을 유지시킨 후 crude bacteriocin 용액 1 mL를 주입하고, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액으로 용출시켰다. 이때 30 mL/hr 유속으로 용출액은 tube 당 5 mL씩 fraction collector에 모았고, 각 용액의 흡광도는 분광광도계(T60 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments, Alma Park, UK)를 이용하여 280nm에서 측정하였으며, 각 분액의 항균 효과는 Paper disc method을 이용하여 측정하였다. SDS-PAGE를 통해 순도 확인 후 Tricine SDS-PAGE 상에서 나타난 band와 protein size marker의 relative mobility를 계산하고 작성한 그래프를 이용하여 분자량을 확인하였다(Zurbriggen et al., 1990).

활성역가 측정(AU/mL)

AU는 항균 물질을 2배씩 점차적으로 희석 하여 clear zone을 형성하는 최대 희석배수의 역수 값을 취하고, 이 값을 1 mL로 환산하는 값에 곱하여 AU/mL로 정하였다(Yamamoto et al., 2003).

L. plantarum ATCC8014의 대사산물 생성량 측정

대사산물의 생성량과 소비량은 다음과 같은 실험 방법으로 실행하였다(Lim, 2015). pH는 pH meter (Starter 2100, Ohaus, Zurich, Switzerland)를 이용하여 배양액의 pH를 측정하였다. lactic acid는 crude bacteriocin solution에 동량의 증류수를 가하여 1% (w/v) phenolphthalein을 첨가한 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정한 다음, 미홍색의 종말점에 도달한 소비량을 측정하여 계산식 (적정산도(%)) = (0.1 N NaOH 소비량 × 0.1 N NaOH 역가 × 0.9)/시료량에 대입하였다. Acetoin은 acetoin solution 5 mL에 0.5% Creatine solution 1 mL과 5% α-naphthol solution 1 mL을 혼합하여 실온에서 1시간 동안 방치하고 분광광도계(T60 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments, Alma Park, UK)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Westerfeld, 1945). 표준곡선은 standard acetoin 2-12 µg/mL을 사용하여 같은 방법으로 처리하여 검량선을 작성하였다. 배지 내 잔당량은 배지를 15,000 × g에서 3분간 원심 분리한 후 상등액을 phenol-sulfuric method (total sugar)법으로 측정하였다(Masuko et al., 2005).

항균물질의 이화학적 특성 조사

L. plantarum ATCC8014가 생산하는 bacteriocin의 pH, 온도, 가수분해효소에 대한 안정성을 측정하였다. pH에 대한 bacteriocin의 안정성은 bacteriocin 시료 용액의 pH를 1 N NaOH 또는 1 N HCl을 이용하여 pH 2-12로 조정한 후 37°C에서 3시간 방치한 다음 pH를 7.0으로 다시 복원한 후 잔존하는 bacteriocin의 활성을 확인하였다. 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 bacteriocin 용액의 pH를 7.0으

로 조정된 후 40, 60, 80, 100°C에서 각각 60분간, 그리고 121°C에서 15분간 처리한 후 잔존하는 bacteriocin의 활성을 확인하였다. 가수분해효소에 대한 안정성은 lysozyme (EC 3.2.1.17, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), α -amylase (EC 3.2.1.1, Sigma Chemical Co.), lipase (EC 3.1.1.3, Type VII, Sigma Chemical Co.), trypsin (EC 3.4.21.4, Sigma Chemical Co.), Proteinase K (EC 3.4.21.64, Sigma Chemical Co.)를 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 4 mg/mL이 되도록 준비하였다. 정제한 효소를 최종 농도가 1 mg/mL가 되도록 bacteriocin 시료에 첨가한 다음 37°C에서 3시간 반응시킨 후 bacteriocin의 역가를 측정하여 확인하였다.

통계 처리

결과는 SAS 9.3 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)을 이용하여 mean \pm SD로 나타내었고, Duncan's multiple range test를 통해 유의성을 검증하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

Trichoderma reesei 유래 β -mannanase 정제

정제효소는 SDS-PAGE에 의해 단일밴드를 나타내었으며, 분자량은 54 kDa으로 추정되었다(Fig. 1). 정제 효소의 비활성은 57.6 units/mg, 정제배율은 10.8배, 수득률은 6.4%로 나타났다. *Bacillus* sp. 유래 β -mannanase의 경우 38.9 kDa이며(Choi & Park, 2004a), *Trichoderma harzianum*은 52.5 kDa (Park et al., 2007), *Thermotoga neapolitana* 5068 (Park et al., 1998)은 65 kDa으로 미생물 유래에 따라 β -mannanase

의 분자량이 다양하게 나타났다.

Trigonella foenum-graecum 유래 galactomannan 가수분해 올리고당의 분리 및 중합도결정

분리도 및 중합도를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 분리도를 확인할 수 있었으며, 중합도 결정을 위해 Timell의 방법에(Timell et al., 1956) 의해 분석한 결과 각각 분리된 Fraction No. 16 가수분해 올리고당의 TRS는 11.18, DRS는 1.90, TRS/DRS는 5.88로, Fraction No. 29 가수분해 올리고당의 TRS는 11.57, DRS는 2.85, TRS/DRS는 4.06으로 나타났다. 또한, Fraction No. 41 GM-Oligosaccharides 가수분해 올리고당의 TRS는 8.18, DRS는 2.64, TRS/DRS는 3.10로, Fraction No. 60 가수분해 올리고당의 TRS는 8.27, DRS는 3.98, TRS/DRS는 2.07로 나타났다. Fraction No. 16 올리고당은 중합도 6, fraction No. 29 올리고당은 중합도 4, Fraction No. 41 올리고당은 중합도는 3, Fraction No. 60 올리고당 중합도 2으로 규명하였다(Fig. 2). D.P 2와 D.P 3, D.P 4와 D.P 6은 각각 LMOS, HMOS로 나누어 향후 실험에 사용 하였다.

반면에 *A. niger* 유래 정제한 β -mannanase으로 *Trigonella foenum-graecum*의 가수분해 결과 중합도 2, 3, 7과 비교했을 때 가수분해 패턴의 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Reid et al., 2003).

MRS와 m-MRS으로부터 생산한 *L. plantarum* ATCC8014의 생육활성 비교

L. plantarum ATCC8014에 대한 생육촉진활성을 측정하기 위해 MRS medium에서 탄소원을 dextrose 대신에 조제된 galactomanno-oligosaccharides을 첨가한 후 평판배양을

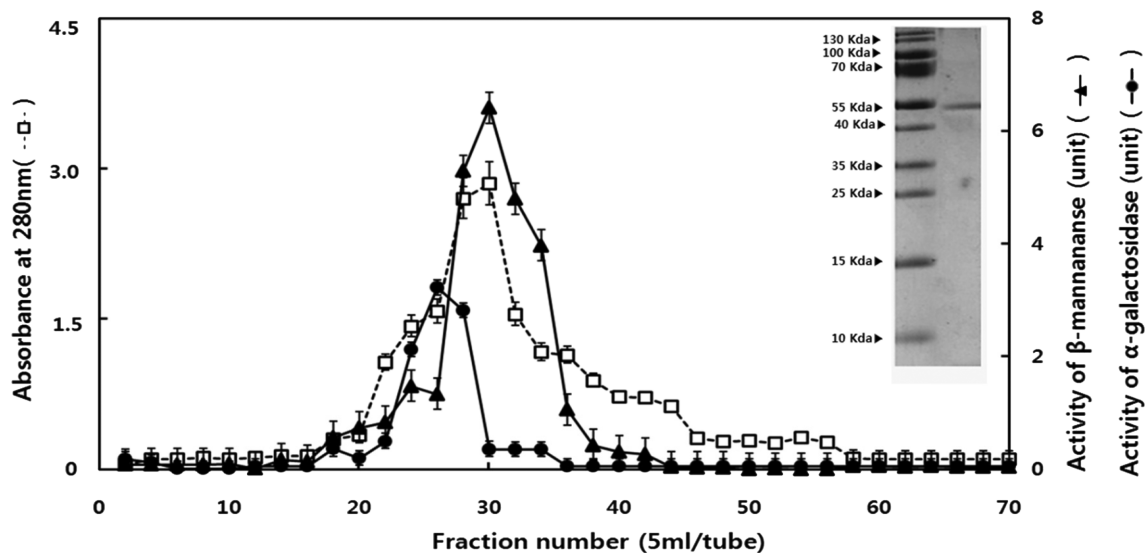


Fig. 1. Purification of β -mannanase from *Trichoderma reesei* on Sephadex G-100. Values of optical density (I) are presented as the mean of three independent experiments with standard error of the mean.

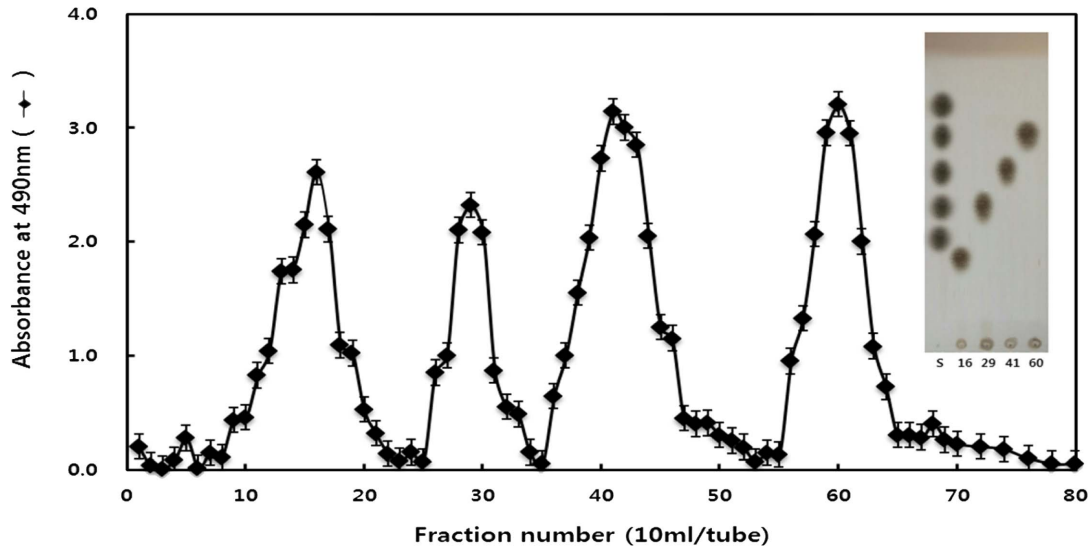


Fig. 2. Separation and TLC analysis of galactomannan hydrolysates by Bio-Gel P-2 chromatography. M: Authentic mannose, mannobiose, mannotriose, and mannotetraose, mannopentose from top to bottom, Fraction No. 16: D.P 6 galactomannan oligosaccharidem 29: D.P 4 galactomannan oligosaccharide, 41: D.P 3 galactomannan oligosaccharide, 60: D.P 2 galactomannan oligosaccharide. Values of optical density (I) are presented as the mean of three independent experiments with standard error of the mean.

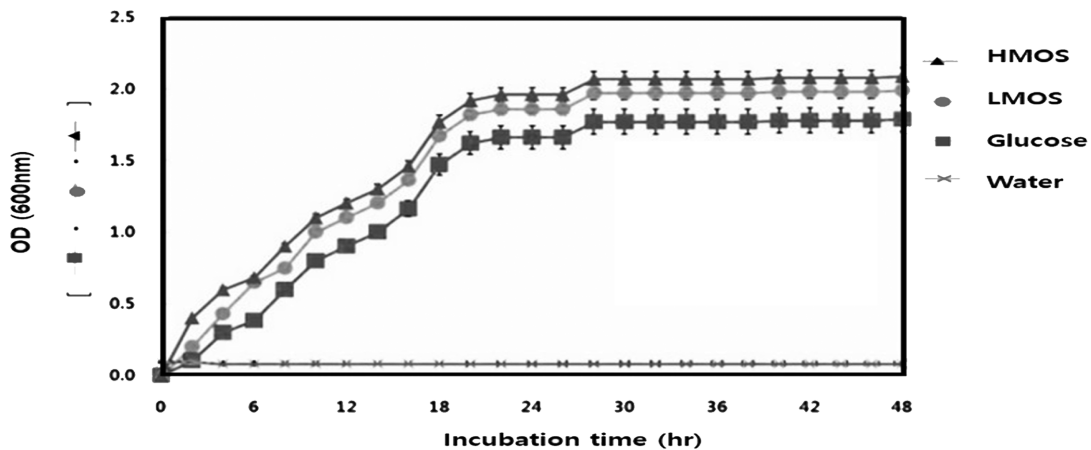


Fig. 3. Growth curve of *L. plantarum* in the modified MRS medium containing galactomannan hydrolysates. HMOS: High-molecular weight galactomanno-oligosaccharides, LMOS: Low-molecular weight galactomanno-oligosaccharides.

하여 측정된 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 생육 촉진 활성을 보였다. *L. plantarum* ATCC8014에서는 HMOS가 첨가된 modified MRS는 standard MRS 보다 1.8배 높은 생육활성을 보였고, LMOS가 첨가된 modified MRS에서는 1.3배 높은 생육 활성을 보였다(Fig. 3). *Bacillus* sp. 유래 정제효소에 의한 galactomannan 가수분해 올리고당의 경우 *B. longum*에서는 D.P. 5 galactomannooligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 10배의, D.P. 7을 처리한 경우에도 7.5배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었다. *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 5에서 9.8배, D.P. 7에서 7.7배의 우수한 생육활성을 나타내었으며 이외에도 *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*에 있어서도 D.P. 5의 경우 2.9-5.7배의 상대활성을

나타내었으나, *B. infantis*에 대한 D.P. 7의 경우에는 표준 MRS배지와 비교하여 0.62배로 감소하였다. 또한 중합도 5의 올리고당이 중합도 7의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다(Choi & Park, 2004b).

Bacteriocin의 정제 및 활성역가 측정

m-MRS 배지에서 배양시킨 *L. plantarum* ATCC8014의 배양액을 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 농축 후, Sephadex G-100으로 Gel filtration chromatogram를 행하였다. Sephadex G-100을 실시한 결과는 Fig. 3과 같으며 fraction No. 16에서 가장 높은 peak가 나타났고 Tricine SDS-PAGE 상에서 확인하였을 때 120 kDa 부근에 단일 band를 보였다(Fig. 3). Todorov et al. (2011)은 파파야(*Carica papaya*) 유래 *L.*

plantarum ST16Pa에서 6.5 kDa의 분자량을 가진 bacteriocin을 분리 해냈다. Bacteriocin은 단백질로 이루어져 있기 때문에 *L. plantarum*은 그 유래에 따라 분자량의 크기가 다양함을 확인 할 수 있었다. 정제전 활성역가는 800 AU/mL 나타냈고, 정제 후 활성역가 값은 3200 AU/mL, 정제 배율은 4배, 수득률은 56.7%로 나타났다(Fig. 4).

MRS와 m-MRS으로부터 생산한 *L. plantarum* ATCC8014의 항균물질 생성량 비교

우수한 생육활성을 보인 HMOS가 첨가된 modified MRS 배양액 내에서 lactic acid는 두 배지 모두 배양 시간에 따라 증가하였다(Table 1). Lactic acid의 생성량은 m-MRS 배지(9.3 g/L) 내에서 MRS 배지(8.5 g/L) 보다 유의하게 더 높게 나타났다. pH는 배양 시간에 따라 감소하였으며 m-MRS 배지 (3.6)가 MRS 배지 (3.7)보다 배양액의 pH가 보다 유의하게 낮았다. 배양액 내에서의 sugar는 두 배지 모두 배양 시간에 따라 감소되었고 48시간 후에는 reducing sugar 성분은 검출되지 않았다. 반면 acetoin은 두 배지 모두 배양 시간에 따라 증가 하였으며 acetoin의 생성량은 m-MRS 배지(4.8 mg/L) 내에서 MRS 배지(4.3 mg/L) 보다 유의하게 높게 나타났다. 정제한 Bacteriocin의 항균활성은

MRS 액체배지에서는 1600 AU/mL, m-MRS 액체배지에서는 3,200 AU/mL로 더 높게 나타났다(Table 1). MRS에 fructooligosaccharide, 폴리덱스트로오스 및 이눌린 등의 prebiotics (20 g/L)를 각각 첨가한 MRS 배지에서 배양하여 *L. lactis* CECT 4434의 세포량을 측정된 결과, 프리바이오틱을 첨가한 배지에서 균 성장량이 유의하게 증가되었으므로 fructooligosaccharide가 유산균의 대사와 세포량 증가에 도움을 주는 것으로 보고하였다(Farina et al., 2015).

Bacteriocin의 이화학적 특성

L. plantarum ATCC8014이 생산하는 bacteriocin의 pH, 온도, 가수분해효소에 대한 안정성을 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. pH 4.0의 좁은 범위에서 비교적 안정한 활성을 나타내었으나, 4.0 미만 및 초과한 pH 값으로 조정하면 활성이 저해되는 것을 볼 수 있었다. Liu & Hansen (1990)는 bacteriocin 용액의 pH가 높을 경우 hydroxides ions, deprotonated amines 및 deprotonated hydroxy group 들이 bacteriocin과 반응하여 bacteriocin의 3차 구조를 변화시킴으로써 활성을 저하시킨다고 보고하였다. 김치에서 분리한 *L. plantarum* KK3 균주가 생산하는 bacteriocin의 항균활성은 pH 3.5-8.5의 넓은 pH 구간에서도 안정함을

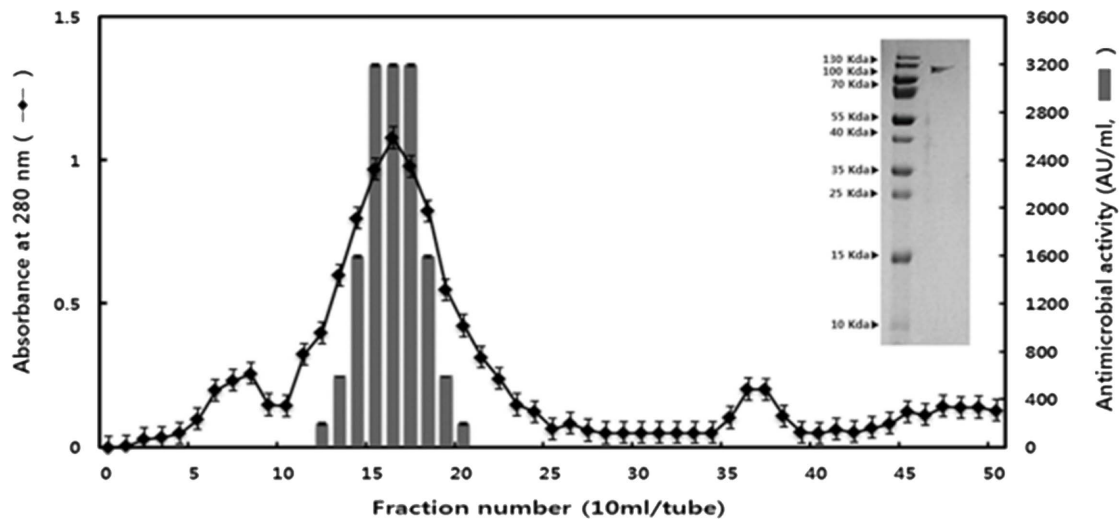


Fig. 4. Purification from culture supernatant of *L. plantarum* ATCC8014 on Sephadex G-100 gel filtration. Changes in Absorbance (black diamond) are indicated. Antimicrobial activity is presented as AU mL⁻¹ (bars) against *S. aureus*. Values of optical density (I) are presented as the mean of three independent experiments with standard error of the mean.

Table 1. Effects of atmosphere composition on biological and physicochemical characteristics and antimicrobial activities of *L. plantarum* ATCC8014 cultures

Medium	Viable cell counts (CFU/mL)	Carbon source	Final sugar remaining (g/L)	Acetoin concentration (g/L)	Lactic acid concentration (g/L)	pH	Bacteriocin activity (AU/mL)
MRS	4.7±2.4×10 ^{8b}	glucose	0	4.3±0.05 ^b	8.5±5.2 ^c	3.7±0.13 ^a	1,600
Modified-MRS	8.6±1.8×10 ^{8ab}	galactomann-oligosaccharides	0	4.8±0.09 ^a	9.3±4.9 ^a	3.6±0.08 ^b	3,200

Values are mean±SD. Different superscript letters (a-c) within the same column show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test

Table 2. Effect of bacteriocin produced from *L. plantarum* ATCC8014 on the *S. aureus* KCCM11335

	Treatment	Bacteriocin activity (%)
pH (at 25°C, 24 h)	Control (no treatment)	100
	2	0
	4	100
	6	0
	8	0
	10	0
	12	0
	Temperature	10°C, 60 min
30°C, 60 min		100
50°C, 60 min		0
70°C, 60 min		0
100°C, 60 min		0
121°C, 15 min		0
Enzyme		Control (no treatment)
	Catalase	100
	Lysozyme	100
	Ribonuclease A	100
	Proteinase K	0
	Trypsin	0
	α -Amylase	100
	Pepsin	100

Control (empty triangles) and treated cells (black squares) with crude bacteriocin.

보고하였다(Chung et al., 2010). 열처리에 따른 bacteriocin의 안정성을 조사한 결과 10°C 30°C의 좁은 범위에서 비교적 안정한 활성을 나타낸 반면, 60°C 이상부터 항균 활성이 저해된 것을 확인할 수 있었다. 김치에서 분리한 *L. plantarum* KK3 균주가 생산하는 bacteriocin의 항균활성은 pH 3.5-8.5의 넓은 pH 구간에서도 안정함을 알 수 있었다. Ribonuclease A, lipase, α -amylase, catalase는 항균활성에 영향을 주지 않았지만 proteinase K, trypsin에 의해서 항균활성이 소실됨을 확인할 수 있었다. 분리된 bacteriocin을 효소처리 후 SDS-PAGE를 통해 확인해 본 결과 α -amylase, lipase에 의해 bacteriocin이 분해된 것을 확인하여 탄수화물과 지질의 결합이 항균 활성에 영향을 주지 않음을 판단할 수 있었다(Table 2).

요 약

본 연구에서는 hemicellulose 기질로서 사용하여 galactomannano-oligosaccharides를 제조하여 prebiotics 소재로써 유용성을 검증 하였으며 *L. plantarum* ATCC8014의 bacteriocin을 정제하여 새로운 대체제인 항균물질의 유용성을 검증하였다. *Trichoderma reesei* 유래 β -mannanase를 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 침전 및 투석하여 DEAE Sephadex A-

50 ion exchange chromatography와 Sephadex G-100 gel chromatography로 정제한 후, tricine SDS-PAGE 상에서 단일 band를 확인하였으며 분자량은 54 kDa으로 나타났다. *Trigonella foenum-graecum*로부터 galactomanno-oligosaccharides을 조제하였고 TLC 및 Timell의 방법에 의해 가수분해 galactomanno-oligosaccharides의 중합도를 2, 3, 4, 6으로 규명하였다. 4가지의 중합도로 가수분해된 galactomanno-oligosaccharides를 LMOS와 HMOS로 나누어 각각 galactomanno-Oligosaccharides가 첨가된 modified MRS를 조제 하여 장내세균에 대한 생육활성을 측정하였다. *L. plantarum*에서는 HMOS를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 2배, LMOS에서 1.8배의 상대 활성을 나타냈다.

Sephadex G-100 gel chromatography로 *L. plantarum* ATCC8014 유래 bacteriocin의 정제를 수행한 결과 분자량은 122 kDa의 확인하였고 *S. aureus* KCCM 11335에 대하여 항균활성을 나타냈다. HMOS를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하였을 때 생육 활성 증가에 따라 bacteriocin 또한 2배 높은 상대활성을 나타냈다. Bacteriocin의 이화학적 특성 조사 결과 따르면 pH와 온도에 비교적 민감하였으며, 단백질 가수분해 효소 처리 시 활성이 소실되어 단백질 물질임을 확인하였다.

References

- Al-Jumaily E, Raheema RH, Abdul-Ratha HA. 2014. Optimal conditions for acidocin production from *Lactobacillus acidophilus* isolate. World J. Pharm. Res. 3: 1773-1785.
- Audisio MC, Oliver G, Apella MC. 2001. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. Int. J. Food Microbiol. 63: 235-241.
- Bera H, Mothe S, Maiti S, Vanga S. 2018. Carboxymethyl fenu-greek galactomannan-gellan gum-calcium silicate composite beads for glipepiride delivery. Int. J. Biol. Macromol. 107: 604-614.
- Choi JY, Park GG. 2004a. Metabolism activity of *Bifidobacterium spp.* by D.Ps of konjac glucomannan hydrolysates. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1186-1191.
- Choi JY, Park GG. 2004b. Purification of *Bacillus* sp. β -Mannanase and the growth activity of *Bifidobacterium spp.* by guar gum hydrolysates. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 32, 117-122.
- Chung JH, Bae YS, Kim YJ, Lee YH. 2010. Characteristics of Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain Isolated from Kimchi. Kor. J. Microbiol. Biotechnol 38: 481-485.
- Datta R, Bandyopadhyay AK. 2005. Development of a new nasal drug delivery system of Diazepam using natural mucoadhesive agent from *Trigonella Foenumgraecum* L. J. Sci. Ind. Res. 64: 973-977.
- Deegan LH, Cotter P.D, Hill C, Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16: 1058-1071.
- Deya MA, Nojiri K, Igarashi S. 1982. Studies on the application

- of galactosyl lactose for infant formula. Yukijirushi Nyugyo Giiyatsu Kenkyusho Hokoku 79: 19-26.
- Farinha LL, Sabo SS, Porto MC, Souza EC, Oliveira M.N, Oliveira RPS. 2015. Influence of prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis*. Chem. Eng. 43: 313-318.
- Genigeorgis CA. 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. Int. J. Food Microbiol. 8:327-360
- Jang JS, Go J.M., Kim YH. 2005. Inhibitory effect of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* by lactic acid and hydrogen peroxide. Kor. J. Env. Health Soc. 31: 115-119
- Jiang JX, Zhu LW, Zhang WM, Sun RC. 2007. Characterization of Galactomannan Gum from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Seeds and Its Rheological Properties, International Journal of Polymeric Materials 56: 1145-1154.
- Jozala AF, de Andrade MS, de Arauz LJ, Pessoa A Jr, Penna TC. 2007. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. Appl. Biochem. Biotechnol. 137: 515-528.
- Laemmler UK. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of head bacteriophage TA. Nature 227: 680-685.
- Lee HJ, Park GG. 2008. Purification of *Xylogone sphaerospora* β -mannanase and growth activity of *Bifidobacterium spp.* by konjac glucomannan hydrolysates. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 51: 159-163.
- Lim ES. 2015. Optimal conditions and effects of prebiotics for growth and antimicrobial substances production of *Lactobacillus brevis* BK11. Korean J. Microbiol. 51: 288-299.
- Liu W, Hansen JN. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2551-2558.
- Mahrous H, Mohamed A, El-Mongy A, El-Batal AI, Hamza HA. 2013. Study bacteriocin production and optimization using new isolates of *Lactobacillus spp.* isolated from some dairy products under different culture conditions. Food Nutr. Sci 4: 342-356.
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI, Lee YC. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. Anal. Biochem. 339: 69-72.
- McCleary BV. 1982. Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar, Carbohydr. Res. 101: 74-79.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem 31: 426.
- O'Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. Front. Microbiol 7: 925.
- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr. J. Biotechnol. 2: 219-227
- Park GG, Lee MS, Park YS. 2013. Purification of β -Mannanase from *Trichoderma harzianum* and the effect of picea abies galactosyl glucomannan hydrolysates on the growth of *Bifidobacterium spp.* Food Eng. Prog. 17: 62-68.
- Park SE, Lee HJ, Kim SO, Kang JB, Park GG. 2007. Growth activity of *Bifidobacterium spp.* by D.Ps of locust bean gum galactomannan hydrolysates from *Trichoderma harzianum* β -mannanase. Food Eng. Prog. 11: 279-283.
- Park WS, Kim HY, Choi YJ. 1998. Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Sporolactobacillus sp.* M201. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 232-237.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, Sinderen DV. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. Genes Nutr. 6 : 285-306.
- Rattanachaikunsopon P , Phumkhachorn P. 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. Ann. Biol. Res 1: 218-228.
- Reid JS, Edwards, Dickson CA, Scott C, Gidley MJ. 2003. Tobacco Transgenic Lines That Express Fenugreek Galactomannan Galactosyltransferase Constitutively Have Structurally Altered Galactomannans in Their Seed Endosperm Cell Walls. Plant Physiol. 131: 1487-1495.
- Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, Lapidus A, Rokhsar DS, Lebrilla CB, German JB, Price NP, Richardson PM., Mills DA. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48: 18964-18969.
- Timell TE, Glaudemans CPJ, Currie AL. 1956. Spectrophotometric method for determination of sugars. Anal. Chem. 28: 1916-1920.
- Toba T. 1985. β -galactosidase-its application to lactose hydrolysis and galactooligo-saccharides product. Japan J. Dairy Food Sci. 34: 169-182.
- Todorov SD, Prévost, H, Lebois M, Dousset X, Le Blanc JG, Franco BDGM. 2011. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. Food Res. Int. 44: 1351-1363.
- Westerfeld WW. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem. 161: 495.
- Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. Epidemiol. Infect. 3: 519-531.
- Yamamoto Y, Togawa Y, Shimosaka M., Okazaki M. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5746-5753.
- Zurbriggen BZ, Bailey M.J, Penttila. M.E, Pou tanen. K, Linko M.. 1990. Pilot scale production of a heterologous *Trichoderma reesei* cellulase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 13: 267-278.